



2/19/1

011201849

WPI Acc No: 1997-179773/199717

XRAM Acc No: C97-057921

**Screening assay for inhibitors of cyclo-oxygenase-2 gene  
expression - using Mono Mac 6 cells does not require carcinogenic phorbol  
ester(s)**

Patent Assignee: NYCOMED AUSTRIA GMBH (NYCO-N); HAFSLUND NYCOMED PHARMA AG  
(HAFS-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
AT 9600932	A	19970215	AT 96932	A	19960529	199717 B
AT 402936	B	19970815	AT 96932	A	19960529	199738

Priority Applications (No Type Date): AT 96932 A 19960529

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
AT 9600932	A	11		
AT 402936	B			Previous Publ. patent AT 9600932

Abstract (Basic): AT 9600932 A

Identification and quantification of substances that inhibit the  
expression of the cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) gene or its induction  
comprises:

(a) stimulating simultaneously or sequentially cells of the human  
Mono Mac 6 (MM6) cell line with potential inhibitors of the expression  
of the cyclo-oxygenase-2 gene and suitable growth and/or  
differentiation factors of cyclo-oxygenase-2 gene expression, and

(b) measuring the level of Cox-2 gene expression by:

(i) adding arachidonic acid and measuring the concn. of the prods.  
of cyclo-oxygenase metabolism in the culture supernatant of the cells  
or

(ii) measuring the amt. of Cox-2 protein produced by the cells by  
Western blot analysis, protein dot blot analysis, quantitative ELISA or  
specific protein assay or

(iii) measuring the amt. of Cox-2-specific mRNA produced by the  
cells by Northern blot analysis, RNA dot blot analysis, quantitative RT  
polymerase chain reaction or other specific mRNA assay.

N.B., according to the disclosure, step (a) comprises stimulating  
the MM6 cells with suitable growth and/or differentiation factors  
before or after incubating the cells with potential inhibitors of Cox-2  
expression.

Also claimed is a method as described above in which the MM6 cells  
are stably or transiently transfected with a promoter-reporter gene  
construct. The construct comprises the regulatory sequences of the  
human Cox-2 gene linked to a suitable reporter gene, pref. the firefly  
luciferase gene. The transfected cells are incubated with potential  
inhibitors. The treated cells are stimulated with growth and/or  
differentiation factors, and the expression of the reporter gene is  
measured using a suitable detection method, pref. chemiluminescence.

ADVANTAGE - It is not necessary to use carcinogenic phorbol esters.

Dwg.0/0

Title Terms: SCREEN; ASSAY; INHIBIT; CYCLO; OXYGENASE; GENE; EXPRESS; MONO;  
MAC; CELL; REQUIRE; CARCINOGEN; PHORBOL; ESTER

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/26

International Patent Class (Additional): C12Q-001/18; C12Q-001/68;

RECEIVED

JUL 18 2002

TECH CENTER 1300/2900

COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

G01N-033/573

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F0100E; B04-H02A; B04-H05C; B04-H08; B10-C04E;  
B11-C07; B11-C08; B12-K04; D05-H09

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M760 M903 N102 Q233 V754

\*02\* M423 M750 M903 N102 Q233 V753 V802 V810

Chemical Fragment Codes (M2):

\*03\* H7 H723 J0 J011 J1 J171 M226 M231 M262 M281 M320 M416 M781 M903 M904

N102 P831 Q233 R04038-D

Chemical Fragment Codes (M6):

\*04\* M903 P831 Q233 R514 R614 R627 R639

Specific Compound Numbers: R04038-D

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

---

© 2002 The Dialog Corporation plc

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 932/96

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **C12Q 1/26**  
C12Q 1/18, 1/68, G01N 33/573

(22) Anmeldetag: 29. 5.1996

(42) Beginn der Patendauer: 15. 2.1997

(45) Ausgabetag: 25. 9.1997

(56) Entgegenhaltungen:

AT 401061B WD 94/14977A1  
C.A. 123(7)1995: 81566X, C.A. 122(13)1995: 154841Z

(73) Patentinhaber:

NYCOMED AUSTRIA GMBH  
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) BENUTZUNG EINER MENSCHLICHEN ZELLINIE ZUR IDENTIFIKATION UND BESTIMMUNG VON SUBSTANZEN  
ZUR HEMMUNG DER INDUKTION DER EXPRESSION DES CYCLOOXYGENASE-2-GENES

- (57) Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die die Expression des Cyclooxygenase-2 Genes oder dessen Induktion der Expression hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 gleichzeitig oder nacheinander mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes und geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden und
- nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder
  - die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 Protein mittels Westernblot Analyse, Protein Dotblot Analyse, ELISA zur quantitativen Cox-2 Protein Bestimmung oder ähnlich geeigneter spezifischer Proteinnachweisverfahren gemessen wird, oder
  - die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 spezifischer BotenRNS mittels Northernblot Analyse, RNA Dotblot Analyse, quantitativer PCR nach reverser Transkription oder ähnlich geeigneter spezifischer BotenRNS-Nachweisverfahren gemessen wird.

Erfindungsgegenstand

Die Erfindung betrifft die Hemmung der Expression von human-COX-2 in Zellen einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Verwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind, die Expression des COX-2 Genes und/oder die Induktion der COX-2 Genexpression zu hemmen.

Technologischer Hintergrund

Das Enzym Cyclooxygenase (COX) (Synonyme: Prostaglandin-endoperoxid Synthase, EC 1.14.99.1, Prostaglandin H Synthase (PGHS), Prostaglandin Synthase (PGS)) wandelt Arachidonsäure in Prostaglandin  $H_2$  um, das dann von verschiedenen Enzymen zu den entsprechenden Prostaglandinen (z.B.  $PGE_2$ ,  $PGF_{1\alpha}$ ), Prostacyclinen und Thromboxanen (z.B.  $TXA_2$ ,  $TXB_2$ ) weiter verstoffwechselt wird (Thiemermann, Eicosanoids, Bd.4, Jg. 1991, S.187-202). Zwei Formen, d.h. Isoenzyme, der COX sind bisher beschrieben worden, die mit COX-1 und COX-2 bzw. PGHS-1 und PGHS-2 bezeichnet werden. Diese beiden Isoenzyme werden durch zwei distinkte Gene mit unterschiedlicher Regulation codiert (Battistini et al., DN&P, Bd.7(8), Jg.1994; S.501-512, Smith et al., Ann.N.Y.Acad.Sci., Bd.714, Jg.1994, S.136-142). So ist COX-1 permanent in fast allen Zellen exprimiert und katalysiert z.B. die Bildung von Prostacyclin, das, sekretiert von Magenschleimhautzellen, diese vor der Magensäure schützt (Whittle et al. Nature, Bd.284, Jg.1980, S.271-273). Hingegen wird COX-2 erst auf inflammatorische Stimuli hin in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten der Haut und anderen Zellen nachweisbar. Diese Stimuli erhöhen die COX-2-Expression um das 10 bis 80-fache (Smith et al., a.a.o.). Inflammatorische Stimuli *in vivo* sind pro-inflammatorische Cytokine oder bakterielle Endotoxine, *in vitro* sind es Mitogene, Cytokine und Lipopolysaccharid (LPS). Die dann-sekretierten Mediatoren, wie z.B.  $PGE_2$  sind u.a. für das entzündliche Geschehen verantwortlich. Die Unterdrückung der Bildung von COX-2 ist eine Wirkung von steroidhaltigen Medikamenten wie zum Beispiel Dexamethason und trägt wesentlich zur entzündungshemmenden Wirkung dieser Stoffe bei.

Verfahren zur Testung der Hemmung der COX-2 Gen Expression

Zur Expression von human COX-2 und Testung auf Inhibition der human COX-2 sind Verfahren beschrieben worden, die sich peripherer Makrophagen/Monozyten bedienen, die nach Isolierung aus dem Blut von Spendern mit LPS stimuliert werden. Dieses Verfahren ist umständlich und zeitraubend. Humane Zelllinien (U937, THP-1, HL60), die nach Stimulation mit Phorbolestern (TPA, PMA) COX-2 exprimieren, sind ebenfalls beschrieben worden (Hoff et al., FEBS, Bd.320, Jg.1993, S.38-42, Sanduja et al., Blood, Bd.78, Jg.1991, S.3178-3185), und der Gebrauch von Zelllinien stellt insofern eine Verbesserung dar, indem der Schritt der Isolierung von Monozyten aus dem Spenderblut und die große Streuung der Stimulierbarkeit der Spendermonozyten entfallen. Der Nachteil der PMA-Stimulation der beschriebenen human Zelllinien besteht jedoch in der Gefährlichkeit im Umgang mit PMA, sodaß diese Verfahren nicht für einen Routinegebrauch geeignet sind. Des weiteren ist PMA kein natürlicher Stimulus zur Aktivierung von Makrophagen.

Überraschenderweise konnte ein Verfahren gefunden werden, das die Nachteile der oben angeführten Verfahren umgeht, da es einfacher durchzuführen und somit zeitsparender ist, die Handhabung der co-carcinogenen Phorbolester unnötig macht, und vor allem aber Stimulantien benutzt, die auch in der Natur vorkommen.

Die Erfindung beschreibt die durch beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Expression von human-COX-2 in Zellen einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Anwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind die Induktion der Expression und/oder die Expression des human-COX-2 Genes zu hemmen. Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die die Genexpression des menschlichen Enzyms Cyclooxygenase-2 hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, und unter der Stimulation potentielle Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression mit-inkubiert werden oder
- b) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden, diese Zellen anschließend mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden.
- c) das Maß der Genexpression des Cyclooxygenase Genes dadurch bestimmt wird, daß

- c.1) nach Zugabe von Arachidonsäure am Ende der Stimulationsphase die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder
- 5 c.2) am Ende der Stimulationsphase die Zellen mittels geeigneter Detergentien lysiert werden, der Gehalt von spezifischen Cyclooxygenase-2 Protein in den Lysaten mittels Western Blot Analyse, Proteindot blot Analyse, ELISA oder ähnlich geeigneter spezifischer Proteinnachweisverfahren bestimmt wird, oder
- 10 c.3) am Ende der Stimulationsphase die Zellen mittels geeigneter Methoden lysiert werden, Boten-Ribonukleinsäuren (mRNS) isoliert werden und der Gehalt von spezifischen Cyclooxygenase-2 mRNS mittels Northern Blot Analyse, mRNS Dotblot Analyse, oder reverser Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder S1 Nukleasenprotektionstest oder irgendeinem sonstigen geeigneten spezifischen mRNS-Nachweisverfahren bestimmt wird, oder
- 15 c.4) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit einem Reportergenhaltigem Plasmid oder Vector, das die genregulativen Sequenzen des menschlichen Cyclooxygenasegens zur Expression eines Reportergens z. B. des Fireflyluciferase-Gens, des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens oder irgendeines anderen geeigneten Reportergens stabil oder transient transfiziert wurden, dann wie unter a) oder b) stimuliert wurden und sodann die Expression des Reportergenproduktes mittels geeigneter Verfahren z.B. Chemilumineszenz oder Farbstoffentwicklung oder ähnlich geeigneter Verfahren als Maß der Cyclooxygenase-2 Genexpression bestimmt wird.
- 20 In der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al., Int.J.Cancer, Bd.41; Jg. 1988, S.456-461) wurde überraschenderweise nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) COX-2 im Zytoplasma gefunden. Vorhandensein von COX-2 in MM6 Zellen nach Stimulation durch LPS wurde einerseits mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) und 2) mittels SDS-
- 25 Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Zelllysates und nachfolgendem Westernblot unter Verwendung des oben genannten spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-2 gezeigt. Des weiteren wurden die Produkte  $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$  und  $\text{TXB}_2$  des Stoffwechselweges der Cyclooxygenasen im Kulturüberstand von stimulierten und unstimulierten Zellen mittels ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) bestimmt und eine vielfach höhere Konzentration dieser Stoffe in den mit LPS stimulierten Kulturen
- 30 gefunden. Weiters wurde sowohl mittels Northernblotanalyse als auch mittels Reversertranskription und Polymerasenkettenreaktion (PCR) gefolgt von Southernblot analyse der PCR-Produkte das stimulationsabhängiges Auftreten und Ansteigen der Cox-2 spezifischen mRNA gefunden. Diese Befunde zeigen klar, daß sich das Enzym COX-2 in diesen Zellen durch Stimulierung mit LPS induzieren läßt. Im Gefolge dessen wurde ein Verfahren zum Suchen und Bestimmen von Hemmstoffen der
- 35 Cox-2 Genexpression bzw der Induktion der Cox-2 Genexpression entwickelt. Dazu werden beispielsweise Zellen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression, gelöst in Kulturmedium oder einem Zellkulturverträglichen Lösungsmittel, beispielsweise phosphat gepufferter Saline, inkubiert und mit einem geeigneten Faktor, wie Lipopolysaccharid die Zellen stimuliert. Danach kann mit verschiedenen Nachweisverfahren die Hemmung der Cox-2 Genexpression bzw. die
- 40 Hemmung der Induktion der der Cox-2 Genexpression erfaßt werden: a) Bestimmung der Cox-2 Enzymaktivität, b) Bestimmung der Cox-2 Proteinmengen, c) Bestimmung der Cox-2 spezifischen BotenRNA. Eine Reduktion der gemessenen Cox-2 spezifischen Enzymaktivität oder der Cox-2 Proteinmengen oder der Cox-2 spezifischen BotenRNA im Vergleich zu einem Kulturansatz, der statt potentieller Hemmstoffe nur Lösungsmittel enthielt, wird als Hemmung der Cyclooxygenase-2 Genexpression gewertet.
- 45 Anstelle der Messung der Cyclooxygenase-2 spezifischen Enzymaktivität oder der Cox-2 Proteinmengen oder der Cox-2 spezifischen Boten-RNA werden beispielsweise die Zellen mittels eines Promotor-Reportergenkonstrukts gentechnologisch so verändert, daß die Expression des Cox-2 Genes auch zur Expression eines leichter erfaßbaren Genprodukts führt, nämlich das eines Reportergens zB. des Gens das für das Enzym Firefly Luziferase kodiert. Aus einer cDNA-Bibliothek wird mittels PCR ein geeignetes DNA-
- 50 Fragment aus den Cox-2 genregulativen Sequenzen (Promotorregion) amplifiziert, kloniert und in ein Plasmid, das das Gen für Firefly Luziferase enthält, inseriert. Dies's Plasmid wird in die Zellen stabil oder transient eingebracht, die Zellen dann mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression, gelöst in Kulturmedium oder einem Zellkultur-verträglichen Lösungsmittel, beispielsweise phosphat gepufferter Saline, inkubiert und mit einem geeigneten Faktor, wie Lipopolysaccharid stimuliert. Danach wird die
- 55 Aktivität der Firefly Luziferase durch Hinzugabe von Substrat beispielsweise Luziferin mittels Chemolumineszenz bestimmt. Eine Reduktion der Chemolumineszenz im Vergleich zu einem Kulturansatz, der statt potentieller Hemmstoffe nur Lösungsmittel enthielt, wird als Hemmung der Cyclooxygenase-2 Genexpression gewertet.

**Beispiel 1**

Mono Mac 6 Zellen werden mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes, gelöst in Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 160 µg/ml nicht-essentielle Aminosäurenmischung (Sigma), 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin, 8.2 µg/ml Insulin, 1 mM Oxalessigsäure 1 mM Pyruvat) inkubiert (10 min, Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), und dann mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit). Danach wird das Kulturmedium erneuert, Arachidonsäure wird hinzugefügt und 15 Minuten weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und auf seinen Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels hin mittels ELISA gemessen als Maß der Cox-2 Enzymaktivität, das unter diesen Umständen das Maß der Cox-2-Genexpression reflektiert.

Tabelle 1

	PGE <sub>2</sub>	PGF <sub>1</sub>	TXB <sub>2</sub>
Zellen nicht stimuliert	5.2%	6%	4.3%
Zellen plus Dexamethason stimuliert	27%	40%	34%
Zellen plus Cycloheximid stimuliert	7%	9%	5%
(Prozentsatz der maximalen Eicosanoidproduktion von LPS-stimulierten Zellen ist angegeben)			

**Beispiel 2**

Mono Mac 6 Zellen werden mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes, gelöst in Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 160 µg/ml nicht-essentielle Aminosäurenmischung (Sigma), 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin, 8.2 µg/ml Insulin, 1 mM Oxalessigsäure 1 mM Pyruvat) inkubiert (10 min, Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), und dann mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit). Danach werden die Zellen lysiert, normalisierte Mengen des Zelllysates einer Westernblotanalyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen human Cox-2 unterzogen. Die quantitative Bestimmung der Cox-2 Proteinmengen als Maß der Genexpression wird mittels Densitometrie der 72-74KD Doppelbande durchgeführt.

Tabelle 2

	Densitometrische Einheiten
Zellen nicht stimuliert	53248
Zellen LPS-stimuliert	216373
Zellen plus Dexamethason dann LPS-stimuliert	140846

**Patentansprüche**

- Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die die Expression des Cyclooxygenase-2 Genes oder dessen Induktion der Expression hemmen, **dadurch gekennzeichnet**, daß Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 gleichzeitig oder nacheinander mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes und geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden und
  - nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder



b) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 Protein mittels Westernblot Analyse, Protein Dotblot Analyse, ELISA zur quantitativen Cox-2 Protein Bestimmung oder ähnlich geeigneter spezifischer Proteinnachweisverfahren gemessen wird, oder

5 c) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 spezifischer BotenRNS mittels Northernblot Analyse, RNA Dotblot Analyse, quantitativer PCR nach reverser Transkription oder ähnlich geeigneter spezifischer BotenRNS-Nachweisverfahren gemessen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit einem Promotor-Reportergen bestehend aus den genregulativen Sequenzen des humanen Cox-2 Genes gekoppelt an ein geeignetes Reportergen, bevorzugt das Gen für Firefly Luziferase, stabil oder transient transfiziert sind,

10 die so gentechnologisch modifizierten Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen inkubiert werden,

15 die solchermaßen behandelten Zellen mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden und die Expression des Reportergenes mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens, bevorzugt Chemilumineszenz, gemessen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren Interleukin-1, TNF-alpha, Lipopolysaccharid oder Interferon- $\gamma$  oder Kombinationen davon, bevorzugt Lipopolysaccharid, verwendet werden.

25

30

35

40

45

50

55

THIS PAGE BLANK (USPTO)